

Разработка технологии селективного отбора *in vitro* регенерантов сахарной свёклы с устойчивостью к кислотности и засухе

Н.Н. ЧЕРКАСОВА (e-mail: biotechnologiya@mail.ru)

Т.П. ЖУЖАЛОВА, д-р биолог. наук, проф. (e-mail: biotechnologiya@mail.ru)

Е.О. КОЛЕСНИКОВА, канд. биолог. наук (e-mail: kolelkb@mail.ru)

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

Введение

Сахарная свёкла является очень требовательной к условиям произрастания культурой. Длительное применение минеральных удобрений приводит к глубоким изменениям физико-химических свойств даже высокобуферных чернозёмов и часто вызывает повышение кислотности почвы. Это губительно сказывается на растениях [5]. Неблагоприятные последствия почвенной кислотности усугубляются в условиях неравномерного выпадения осадков в течение вегетационного периода на фоне повышения среднемесячных температур. Усиление давления окружающей среды расширяет спектр стрессовых поражений растений. В связи с этим особое значение приобретает создание растений сахарной свёклы с высокими адаптивными свойствами, обеспечивающими комплексную устойчивость к кислотности и дефициту влаги (осмотическому стрессу), что приведёт к существенному повышению урожайности культуры [2, 3].

Использование селективных сред *in vitro* позволяет имитировать естественные стрессовые условия. Это обеспечивает экспрессию генов устойчивости и даёт возможность отбирать нужные варианты. Разработка технологии клеточной

селекции *in vitro* позволит проводить испытание и отбор устойчивых форм на клеточном уровне, а также создавать новый исходный материал за короткий период, тем самым сокращая сроки создания высокопродуктивных сортов, приспособленных к возделыванию в стрессовых условиях [6].

Воздействие стрессов при культивировании *in vitro* органов и тканей сахарной свёклы представляет как научный, так и практический интерес в плане создания форм с устойчивостью к засухе и кислотности почвы [1]. Таким образом, разработка условий для построения селективных систем *in vitro*, направленных на отбор толерантных к засухе и кислотности форм для использования их в селекции, является одним из перспективных и важных направлений биотехнологии растений.

Цель работы заключалась в разработке технологии создания *in vitro* линий сахарной свёклы с устойчивостью к эдафическим факторам.

Материалы и методы исследования

Материалом исследований служили генотипы сахарной свёклы 09001-МС, 09002-ОП, 09003-ОП, 09005-ОПМ лаборатории исходного материала ФГБНУ «ВНИИСС

имени А.Л. Мазлумова». Индукция регенерации проводилась на питательных средах В5 и MS, дополненных регуляторами роста (БАП, кинетин, ИУК, ГК, НУК). Культивирование растений осуществлялось при температуре 26 °С, 16-часовом фотопериоде, освещённости 5000 люкс, относительной влажности воздуха 70 %. Семена предварительно очищали от перикарпа и обеззараживали раствором хлорамина «Б» в течение 1 часа. Для моделирования засухи использовали неионный и неметаболизированный осмотик сорбит 0,40–0,45 М, кислотности – подкисленную до рН 4,0 питательную среду.

Результаты исследований и обсуждения

Проведённые исследования показали, что использование селективной питательной среды с содержанием сорбита 0,45 М при рН 3,5 вызывало у всех генотипов прорастание зрелых зародышей семян с частотой до 7,3–8,6 %, при низкой (от 3,7 до 4,3 %) выживаемости регенерантов. Добавление БАП-6 в селективные среды способствовало активации прорастания зрелых зародышей семян до трёх раз, что составило 15,0–22,7 %. Выживаемость регенерантов при этом варьировала от 6,0 до 8,6 %,

в 1,6–2,3 раза превышая контроль (табл. 1). По-видимому, гормон принимает активное участие в физиологических реакциях, связанных с активацией работы белок-синтезирующего аппарата клеток [4, 7]. В жёстких селективных условиях этот гормон стимулировал прорастание семян за счёт усиления защитных свойств клеточных тканей, что повышало устойчивость растений к действию стрессовых факторов.

Повторное индуцирование прямой регенерации отобранных регенерантов на идентичной селективной среде (сорбит 0,45 М; рН 3,5) показало высокую толерантность к эдафическим стрессам, где количество устойчивых регенерантов варьировало от 58 до 66 %. Микроклоны хорошо развивались в селективных условиях, что сопровождалось образованием нормальных черешковых листьев с цельной пластинкой, тупой верхушкой и клиновидным основанием, сбегаящим по черешку. Проведённые эксперименты позволили отобрать необходимое количество микроклонов изучаемого материала [8].

Заключительным этапом по созданию растений сахарной свёклы с устойчивостью к эдафическим факторам является процесс корнеобразования регенерантов в селективных условиях. Результаты исследований показали, что формирование корневой системы микроклонов в селективных условиях зависело от состава питательной среды. Так, при содержании ИМК в количестве 1,5 мг/л было отмечено снижение ризогенеза (3,9–6,8 %), а при ИМК 0,1 мг/л и 1,0 мг/л БАП отмечалось разрастание листовой поверхности микроклонов и отсутствие корней. На среде с 1,0 мг/л ИМК было отмечено наибольшее корнеобразование с частотой от 74,3 до 84,0 %. Поэтому данная питательная среда в дальнейшем использовалась при отборе в селективных условиях.

Таблица 1. Влияние БАП-6 на эффективность прорастания семян в селективных условиях

Генотип	Содержание БАП, мг/л	Количество регенерантов, %	
		Проросло	Выжило
09001МС	0 контроль	7,6	3,8
09002ОП-1		7,8	3,9
09003ОП		8,6	4,3
09005ОПМ		7,3	3,7
09001МС	0,2	15,0	6,0
09002ОП-1		16,4	6,4
09003ОП		22,7	8,6
09005ОПМ		22,5	8,5

Было выявлено, что питательная среда с кислотностью рН 4,0 и содержанием сорбита 0,45–0,40 М сильно тормозила рост корневой системы и вызывала гибель микроклонов (рис. 1).

Снижение содержания сорбита до 0,35 М при рН 4,0 позволило активизировать процесс корнеобразования в пределах 60,0–72,5 % и получить устойчивые растения-регенеранты изучаемых генотипов к эдафическому стрессу (табл. 2).

Таким образом, выявлена селективная питательная среда с содержанием сорбита до 0,35 М при рН 4,0 для отбора микроклонов на стадии корнеобразования. В результате исследований было отобрано четыре изогенных линии с устойчивостью к эдафическому стрессу.

Полученные микроклоны адаптировались в условиях закрытого грунта при выживаемости 82,6–88,2 %. Растения активно раз-

Таблица 2. Влияние селективных условий на эффективность ризогенеза микроклонов сахарной свёклы

Генотип	Содержание сорбита, М	Значение рН	Корнеобразование, %
09001МС	0,35	4,0	70,0
09002ОП-1	– « –	– « –	72,5
09003ОП	– « –	– « –	65,0
09005ОПМ	– « –	– « –	60,0

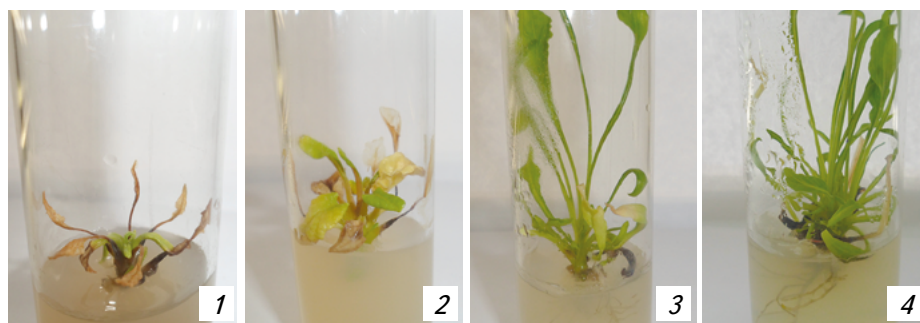


Рис. 1. Формирование корней у микроклонов в селективных условиях у № 1, 2 – рН 4,0, сорбит 0,45–0,40 М; у № 3, 4 – рН 4,0, сорбит 0,35 М

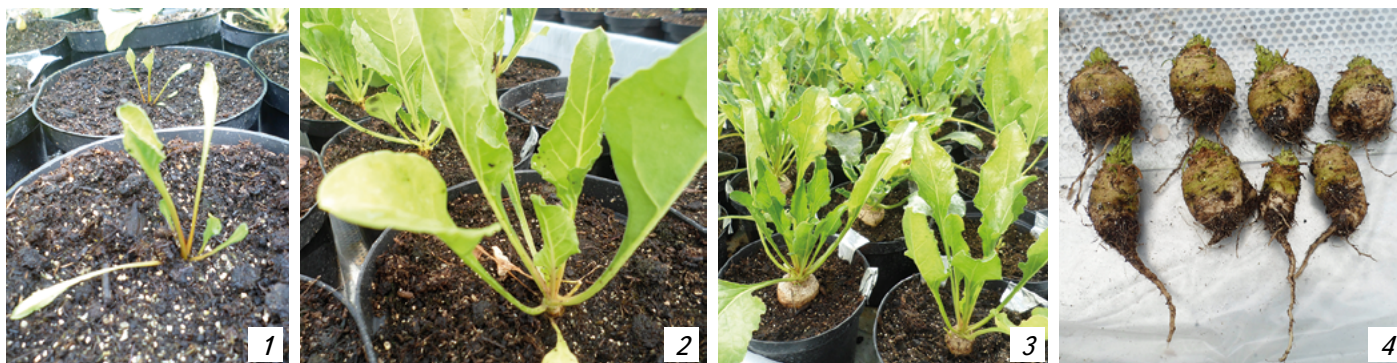


Рис. 2. Развитие микроклонов в условиях теплицы от регенеранта до штеклинга (1–4)

вивались и формировали штеклинги в течение трёх месяцев (рис. 2).

Заключение

Проведённые исследования позволили отобрать четыре линии сахарной свёклы, устойчивые к эдафическому стрессу, разработать схему их создания, включающую в себя:

- культивирование зрелых зародышей на этапе прорастания в селективных условиях (рН 3,5; сорбит 0,45 М) для отбора устойчивых регенерантов;
- повторное культивирование устойчивых регенерантов в селективных условиях (рН 3,5; сорбит 0,45 М);
- отбор микроклонов при корнеобразовании (рН 4,0; сорбит 0,35 М);
- перевод отобранных микроклонов в грунт;
- получение штеклингов сахарной свёклы.

Разработанная схема даёт возможность получать устойчивые к эдафическим факторам окружающей среды формы сахарной свёклы для использования в селекции культуры.

Внедрение данной технологии в селекционно-семеноводческий процесс является перспективным инновационным приёмом, обеспечивающим создание нового исходного материала, приспособленного к возделыванию в стрессовых условиях.

Список литературы

1. Гаргаун, С.И. Толерантность экплантов мягкой пшеницы к воздействию осмотического стресса в условиях *in vitro* / С.И. Гаргаун, С.А. Игнатова // Вестник харьковского национального аграрного университета. – 2007. – В.1 (10). С. 111–115.
2. Зайова, Е.Г. Използване на *in vitro* методи за отбор на форми захарно цвёкло, устойчиви на неблагоприятни условия: автореф. дис. ... д-ра биолог. наук / Е.Г. Зайова. – София, 2003. – 40 с.
3. Зобова, Н.В. Повышение устойчивости ячменя к стрессовым биотическим и абиотическим факторам в Сибири: автореф. дис. ... д-ра с/хнаук / Н.В. Зобова. – Красноярск, 2009. – 66 с.
4. Кулаева, О.Н. Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов / О.Н. Кулаева, В.В. Кузнецов // Физиология растений. – 2002. – Т. 49. – № 4. – С. 626–64.
5. Кураков, В.И. Влияние длительного применения удобрений на изме-

нение агрохимических показателей чернозёма выщелоченного и продуктивность сахарной свёклы в севообороте / В.И. Кураков, Е.В. Попов, М.М. Жуков // Материалы Международной научной конференции. – Воронеж : ВГУ, 2004. – С. 463–460.

6. Никитина, Е.Д. Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам / Е.Д. Никитина, Л.П. Хлебцова, О.В. Ерещенко // Известия Алтайского государственного университета. – 2014. – В. 3. – Т. 2. – С. – 50–54.

7. Таланова, В.В. Фитогормоны как регуляторы устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды: автореф. дис. ... д-ра биолог. наук / В.В. Таланова. – Петрозаводск, 2009. – 44 с.

8. Черкасова, Н.Н. Создание растений-регенерантов сахарной свёклы, устойчивых к комплексу стрессовых факторов / Н.Н. Черкасова, Т.П. Жужалова, Е.О. Колесникова // Сахар. – 2018. – № 5. – С. 28–30.

Аннотация. Представлены результаты селективного отбора *in vitro* форм сахарной свёклы, устойчивых к стрессовым эдафическим факторам внешней среды. Разработана технология получения регенерантов, способных развиваться в условиях засухи и повышенной кислотности среды. Отобраны устойчивые линии, которые будут использованы в селекционном процессе как новый исходный материал.

Ключевые слова: стресс, растения-регенеранты, *in vitro*, сорбит, селективная питательная среда, засуха, кислотность, сахарная свёкла.

Summary. The results of selective selection of sugar beet forms resistant to stress edaphic environmental factors *in vitro* are presented. The technology of obtaining regenerants capable of developing in conditions of drought and high acidity of the environment. Selected stable lines to be used in the selection process as a new source material.

Keywords: stress, regenerative plants, *in vitro*, sorbitol, selective nutrient medium, drought, acidity, sugar beet.